Aus dem Medizinischen Strahleninstitut
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. W. Frommhold

NACHWEIS EINER LOKALISATIONS- und GEWEBS-SPEZIFISCHEN WIRKUNG VON BLEOMYCIN®

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt
von
Volker Ulrich Bürkle
aus
Trossingen

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0003

Aus dem Medizinischen Strahleninstitut
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. W. Frommhold

NACHWEIS EINER LOKALISATIONS- und GEWEBS-SPEZIFISCHEN WIRKUNG VON BLEOMYCIN®

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt
von
Volker Ulrich Bürkle
aus
Trossingen

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. H.-E. Hoffmeister
1. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Frommhold
2. Berichterstatter:	Professor Dr. K.-W. Peters

FOTODRUCK H. RESCH · Georgstr. 50 · 7402 Kirchentellinsfurt

Meinen Eltern, meiner Frau Annegret
und meinem Bruder Gernot in Dank-
barkeit gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS:

		Seite
1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1.	Versuchstiere	
2.2.	Versuchsgruppen	
2.3.	^{3}H-Thymidin-Applikation und Tötung der Tiere	
2.4.	Histologische und autoradiographische Technik	
2.5.	Auswertung der Autoradiogramme	
2.6.	Mathematisch-statistische Testverfahren	
3.	ERGEBNISSE zur Proliferationsaktivität verschiedener Gewebe unter Bleomycin^{R}-Einwirkung (bis 72 Stunden nach einmaliger Applikation):	6
3.1.	MARKIERUNGS-INDICES	7
3.1.1.	Plattenepithel-Fusshaut	7
3.1.1.1.	Befunde	
3.1.1.2.	Mathematisch-statistische Auswertung	
3.1.2.	Plattenepithel-Schwanzhaut	10
3.1.2.1.	Befunde	
3.1.2.2.	Mathematisch-statistische Auswertung	
3.1.3.	Plattenepithel-Zunge	13
3.1.3.1.	Befunde	
3.1.3.2.	Mathematisch-statistische Auswertung	
3.1.4.	Plattenepithel-Oesophagus	17
3.1.4.1.	Befunde	
3.1.4.2.	Mathematisch-statistische Auswertung	
3.1.5.	Schleimhaut-Drüsenmagen	20
3.1.5.1.	Befunde	
3.1.5.2.	Mathematisch-statistische Auswertung	

3.1.6. Schleimhaut-Ileum Seite
3.1.6.1. Befunde 23
3.1.6.2. Mathematisch-statistische Auswertung
3.1.7. Schleimhaut-Colon 26
3.1.7.1. Befunde
3.1.7.2. Mathematisch-statistische Auswertung
3.1.8. Übergangsepithel-Harnblase 29
3.1.8.1. Befunde
3.1.8.2. Mathematisch-statistische Auswertung
3.1.9. Übergangsepithel-Nierenbecken 32
3.1.9.1. Befunde
3.1.9.2. Mathematisch-statistische Auswertung
3.2. ZUR LOKALISATIONS-SPEZIFISCHEN WIRKUNG VON BLEOMYCIN^R 35
3.2.1. Vergleich der Bleomycin^R-Wirkung auf Plattenepithelverbände verschiedener Lokalisation
3.2.2. Vergleich der Bleomycin^R-Wirkung auf Schleimhautepithelien und Übergangsepithelien verschiedener Lokalisation
3.3. ZUR GEWEBSSPEZIFITÄT von Bleomycin^R 41
3.3.1. Vergleich der Bleomycin^R-Wirkung auf Plattenepithel-, Schleimhautepithel-, Übergangsepithel - Gruppen
3.4. ÜBERPRÜFUNG DER ERGEBNISSE MITTELS PARAMETERFREIER TESTS 43
4. DISKUSSION 45
5. ZUSAMMENFASSUNG 56
6. LITERATURVERZEICHNIS 58

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Durch Chemotherapie maligner Tumoren werden auch nicht den Neubildungen zugehörige Zellen in hohem Maße der cytotoxischen bzw. cytostatischen Einwirkung ausgesetzt. Bei zahlreichen bösartigen Geschwülsten ist im Vergleich zu den sogenannten Wechselgeweben (Knochenmark, Epithel des Intestinaltraktes) eine niedrigere Proliferations-Aktivität gegeben. Dies erklärt in vielen Fällen einerseits ernüchternde Behandlungs-Mißerfolge hinsichtlich des Tumor-Wachstums, andererseits das Auftreten gravierender Nebenwirkungen wie Knochenmarksschädigung, Reaktionen des Gastro-Intestinaltraktes, Immundepression u.a..
Die Dosierung antineoplastischer Substanzen ist damit meist durch ihre Nebenwirkungen limitiert. Dazu kommt, daß die "Sensibilität" der Tumoren gegen die heute gebräuchlichen Chemotherapeutika so vielfältig ist, wie der Formenreichtum malignen Wachstums.

Diese Gegebenheiten lassen erwarten, daß nur Substanzen mit Gewebs- und / oder Lokalisations-spezifischer Wirkung allein oder in Kombination mit anderen Methoden weitere wesentliche Therapie-Erfolge erhoffen lassen.

1966 wurde von UMEZAWA et al. (29) aus Streptomyces verticillus das antineoplastisch wirksame Antibiotikum Bleomycin isoliert. Die chemische Struktur gilt heute als weitgehend aufgeklärt (UMEZAWA 1977 (28)). Dieser Substanz wurde von ICHIKAWA et al. (1969 (8)) eine spezifische Wirkung vor allem auf Plattenepithelcarcinome der Haut zugeschrieben. Außer Untersuchungsberichten aus der Dermatologie liegen inzwischen zahlreiche klinische Behandlungsstudien anderer Fachbereiche (Gynäkologie, Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Urologie) mit recht unterschiedlichen Ergebnissen vor. Darnach nehmen

manche Untersucher eine Tumor- bzw. Gewebs-spezifische Wirkung von Bleomycin^{R} nicht an (22), während andere Autoren Indizien für eine Spezifität des Wirkungsbereichs von Bleomycin^{R} mitteilen, die auf eine unterschiedliche Aufnahme, Verteilung, Aktivierung und Inaktivierung der Substanz in verschiedenen normalen und entarteten Zellsystemen hindeuten (7,9,10,15,30,31,32)

Ziel vorliegender Arbeit ist es, experimentell zu prüfen

1. wie sich die Proliferations-Aktvität verschiedener Gewebe bis 72 h nach einmaliger Bleomycin^{R}-Applikation verhält;
2. ob sich eine Lokalisations-spezifische Wirkung von Bleomycin^{R} (Vergleich von Zellpopulationen gleicher Art aber unterschiedlicher Lokalisation) und / oder
3. ob sich eine Gewebs-spezifisch unterschiedliche Wirkung (Vergleich Plattenepithelien : Schleimhautepithelien : Übergangsepithelien) von Bleomycin^{R} sichern läßt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Insgesamt wurden 42 weibliche Mäuse (NMRI - Tiere, Züchter: Zentralinstitut für Labortiere, Hannover) mit einem Körpergewicht von 28 - 30 g (gehalten bei Altromin-Standard-Diät, Trinkwasser ad libitum und einem Tag - Nacht - Wechsel von 12 Stunden) in den Versuch einbezogen.

2.2. Versuchsgruppen

Die Tiere wurden in 7 Versuchsgruppen zu je 6 Tieren eingeteilt. Gruppe I blieb unbehandelt und diente als Kontrollkollektiv. Gruppe II bis VII erhielten eine einmalige Bleomycin^{R}-Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht s.c. injiziert zu unterschiedlichen Zeiten vor der Tötung der Tiere.

2.3. ^{3}H-Thymidin-Applikation und Tötung der Tiere

Sämtliche 42 Tiere wurden durch Entbluten in Thiogenal^{R}-Narkose getötet. Die Tötung der Tiere erfolgte zwischen 20 und 23 Uhr nach folgendem Zeitplan:

Gruppe I	(unbehandelte Kontrolltiere)	
Gruppe II	4 Stunden	nach Bleomycin^{R}-Applikation
Gruppe III	8 Stunden	" " "
Gruppe IV	16 Stunden	" " "
Gruppe V	24 Stunden	" " "
Gruppe VI	48 Stunden	" " "
Gruppe VII	72 Stunden	" " "

Jeweils eine Stunde vor der Tötung wurden jedem Tier 2 µCi/g Körpergewicht Thymidin-Methyl-^{3}H mit der spezifischen Aktivität 5,0 Ci/mMol, bezogen vom Radiochemical Centre, Amersham, appliziert.

2.4. Histologische und autoradiographische Technik:

Die bei der Tötung entnommenen Gewebsstücke

Fusshaut	(=F)	- plantar -
Schwanzhaut	(=S)	- Manschette 1 cm dorsal der Schwanzhaut -
Zunge	(=Z)	- Zungenrücken -
Oesophagus	(=O)	- 1 cm proximal der Cardia -
Druesenmagen	(=D)	- Bezirk unmittelbar nach Übergang von Vormagen in Druesenmagen -
Ileum	(=I)	- 5 cm proximal vom Coecum -
Colon	(=C)	- Colon ascendens 2 cm aboral des Coecum -
Niere	(=N)	- Nierenbeckenbereich -
Harnblase	(=H)	

wurden sofort in 4%-igem Formalin (gepuffert bei pH 7,0) 24 Stunden fixiert. Anschließend erfolgte die Entwässerung über eine Alkohol-Benzol-Reihe und die Einbettung in Paraplast. Mit dem Schlittenmikrotom wurden 4 µ dicke Schnitte angefertigt. Nach der Entparaffinierungsreihe wurden die Schnitte in Ilford K5-Emulsion mit der Dipping-Methode beschichtet. Nach Trocknung wurden sie 5 Tage bei 4°C in luft- und lichtdichten Präparatekästen exponiert. Die Entwicklung der Autoradiogramme erfolgte mit dem Kodak D 19^{R}Entwickler, die Fixierung mit Kodak-Unifix^{R} Fixiersalz. Entwicklung und Fixierung wurden in der Dunkelkammer bei dunklem Rotlicht vorgenommen. Nach Abschluß der phototechnischen Behandlung erfolgte die Färbung aller Präparate außer denen des Druesenmagens mit Mayerschem Hämalaun.

Für die Druesenmagenpräparate wurden zur besseren Differenzierung der Zelltypen das nach DEIMLING et al. (1968 (5)) für die nachträgliche PAS-Färbung emulsions-

schichteter und entwickelter autoradiographischer Paraffinschnitte beschriebene Verfahren angewendet:

Nach Fixierung und einstündiger Wässerung wurden die Präparate 40 Minuten in eine 0,1%ige Goldchloridlösung eingestellt.
(Durch diese Behandlung erfährt die Oberfläche der Silberkörner einen vor oxydativen Einwirkungen schützenden Goldfilmüberzug). Daran schloß sich ein 30 Min. dauerndes Waschen in 1 n HCl bei zweimaligem Wechsel.
Die Präparate wurden daraufhin 2 Stunden unter fließendem Wasser gespült.

Darauf folgte die modifizierte PAS-Färbung:

1.) 10 min 0,5 %ige Perjodsäure
2.) kurzes Eintauchen in 70 %igen Alkohol
3.) 1 min Hotchkiss-Lösung
4.) kurzes Eintauchen in 70 %igen Alkohol
5.) Abspülen in aqua dest.
6.) 15 min Behandlung mit Schiffschem Reagenz
7.) 15 min Wässern
8.) 2 min Weigerts Hämatoxylin
9.) Differenzieren in HCl-Alkohol
10.) 10 min Bläuen in kaltem Wasser
11.) aufsteigende Alkoholreihe und Eindecken in Eukitt

Auswertung der Autoradiogramme

Es wurde jeweils der Markierungs-Index

$$= \frac{\text{Zahl der markierten Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \quad (\text{in Prozent})$$

bestimmt. Bei allen Präparaten wurden in Karyolyse begriffene Zellen nicht mitgezählt. Als markiert galten Zellen, deren Kern mindestens mit 10 Silberkörnern be-

legt war.
Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der markierten Zellen aus 2000 Zellen:
bei Platten-Epithelien unterschiedlicher Lokalisation der B a s a l s c h i c h t;
bei dem Übergangs-Epithel der ableitenden Harnwege des gesamten Epithels;
bei der Schleimhaut des Druesenmagens unter Berücksichtigung des Oberflächen- und Drüsen-Isthmus-Epithels (in die Tiefe bis zur jeweils ersten Parietal-Zelle reichend).
bei der Schleimhaut des Ileum und Colon wurde jeweils die Gesamtzellzahl pro Krypte durch Auszählen der Kerne von 20 exakt längsgetroffenen Krypten in einem Darmschnitt-Präparat jeden Tieres festgestellt. Die Zählung der markierten Zellen erfolgte an den selben 20 Krypten.

Mathematisch-statistische Auswertung:
Bei der mathematisch-statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden der Dunnett-Test (J.Zar: Biostatistical Analysis, 1974, 157, (34)), der paarweise t-Test mit Korrekturen für ungleiche Varianzen (L.Sachs: Statistische Auswertungsmethoden, 1969, 270, (23)), der parameterfreie multiple U-Test (nach Mann und Whitney) sowie ein zum Dunnett-Test analoger parameterfreier Test (J.Zar: Biostatistical Analysis, 1974, 158) angewandt.

3. E R G E B N I S S E

zur Proliferationsaktivität verschiedener Gewebe unter Bleomycin^{R}-Einwirkung (bis 72 Stunden nach einmaliger Applikation):

Zunächst sollte geklärt werden, ob sich die Mittelwerte der Markierungs-Indices auf den einzelnen Zeitstufen (4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h, und 72 h nach In-

jektion von 20mg/kg Körpergewicht Bleomycin^{R}) vom Mittelwert der Markierungs-Indices des Kontrollkollektivs bei jedem einzelnen der untersuchten Gewebe unterscheiden. Dazu erfolgte zunächst die Bestimmung der

3.1. Markierungs-Indices

mit folgenden Ergebnissen:

3.1.1. Plattenepithel-Fusshaut

3.1.1.1. Befunde:

5,7 % ± 2,50 von 2000 untersuchten Zellkernen der Basalzellschicht wurden bei Gruppe I im Mittel als markiert gezählt. Bei der Gruppe II sank der Markierungsindex auf 3,35 % ± 1,03, bei der Gruppe III auf 2,64 % ± 1,12, bei der Gruppe IV auf 1,99 % ± 0,48 und bei Gruppe V auf 0,87 % ± 0,48. An Gruppe VI mit 3,74 % ± 1,06 und Gruppe VII mit 4,18 % ± 2,55 zeichnet sich eine einsetzende Erholung ab (Abb. 1).

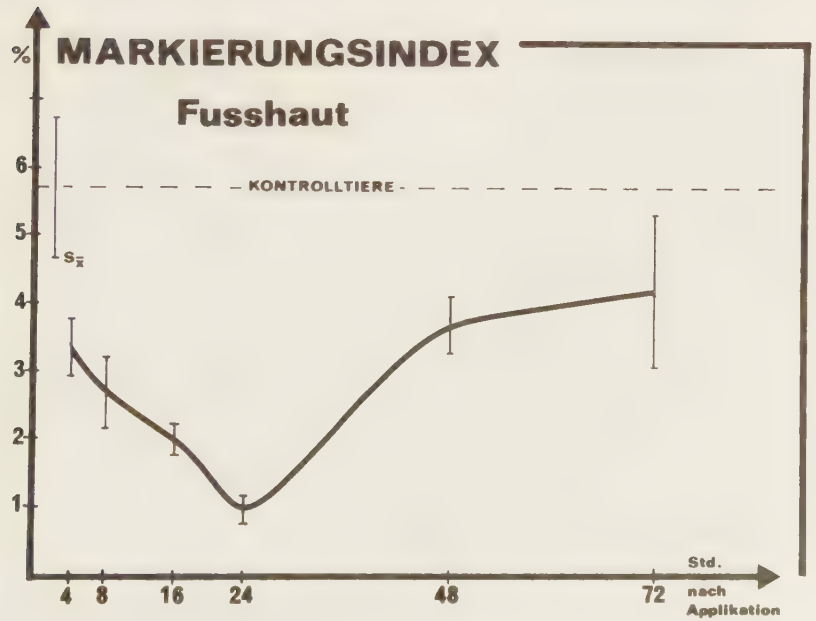


Abb. 1

Im Einzelnen:

Kontrollgruppe I:

Tier	0/1	3,35 %
"	0/2	2,6 %
"	0/3	5,2 %
"	0/4	6,6 %
"	0/5	7,15 %
"	0/6	9,3 %

$\bar{x}$ = 5,7 s = 2,50

Gruppe II:
(4 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	4/1	4,6 %
"	4/2	3,2 %
"	4/3	2,95 %
"	4/4	4,6 %
"	4/5	2,15 %
"	4/6	2,6 %

$\bar{x}$ = 3,35 s = 1,03

Gruppe III:
(8 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	8/1	0,8 %
"	8/2	2,65 %
"	8/3	2,8 %
"	8/4	3,8 %
"	8/5	3,15 %
"	8/6	nicht markiert!

$\bar{x}$ = 2,64 s = 1,12

Gruppe IV:
(16 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	16/1	1,75 %
"	16/2	2,8 %
"	16/3	2,2 %
"	16/4	2,0 %
"	16/5	1,4 %
"	16/6	1,8 %

$\bar{x}$ = 1,99 s = 0,48

Gruppe V:
(24 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	24/1	1,05 %
"	24/2	0,9 %
"	24/3	1,7 %
"	24/4	0,6 %
"	24/5	0,3 %
"	24/6	0,65 %

$\bar{x}$ = 0,87 s = 0,48

Gruppe VI: (48 Stunden nach BLM-Applikation)		Gruppe VII: (72 Stunden nach BLM-Applikation)	
Tier 48/1	3,9 %	Tier 72/1	2,1 %
" 48/2	3,8 %	" 72/2	8,0 %
" 48/3	4,25 %	" 72/3	nicht markiert!
" 48/4	1,8 %	" 72/4	2,1 %
" 48/5	3,7 %	" 72/5	3,2 %
" 48/6	5,0 %	" 72/6	5,5 %
$\bar{x}$ = 3,74	s = 1,06	$\bar{x}$ = 4,18	s = 2,55

.1.1.2. Mathematisch-statistische Auswertung: (Tab. 1)

Zeitraum nach BLM-Applikation

4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h	
			+			Dunnett-Test
			+			multipler t-Test
			+			multipler U-Test

Dunnett-Test + = signifikante Abweichung auf dem zweiseitigen 0,05 Niveau für die gesamte Spalte

++ = signifikante Abweichung auf dem zweiseitigen 0,01 Niveau für die gesamte Spalte

Multipler t-Test + = signifikante Abweichung auf dem zweiseitigen 0,01 Niveau für das betreffende Kästchen

(+) = signifikante Abweichung auf dem zweiseitigen 0,02 Niveau für das betreffende Kästchen

multipler U-Test + = signifikante Abweichung auf dem zweiseitigen 0,01 Niveau für das betreffende Kästchen

(+) signifikante Abweichung auf dem zweiseitigen 0,02 Niveau für das betreffende Kästchen.

Die 24h-Werte unterscheiden sich auf dem zweiseitigen 0,05 Niveau im Dunnett-Test. In den Kontroll-Testen findet sich ein Unterschied auf dem zweiseitigen 0,01 Niveau.

3.1.2. Plattenepithel-Schwanzhaut

3.1.2.1. Befunde:

Bei weitgehend regelmäßiger Markierung in der Basalschicht der Schwanzepidermis fand sich bei den unbehandelten Tieren der Gruppe I nach Auszählung der markierten Zellen auf 2000 Zellen das arithmetische Mittel von 2,76 % $\pm$ 1,08 für den Markierungsindex. Die verminderte Zahl DNA-synthetisierender Zellen senkte diesen Wert 4 Stunden nach BLM-Applikation (Gruppe II) auf 2,57 % $\pm$ 1,44. 8 Stunden (Gruppe III) nach der Behandlung ließ sich ein mittlerer Index von 2,12 % $\pm$ 1,08 berechnen. In der Gruppe IV und V beobachteten wir die niedersten Werte mit 1,33 % $\pm$ 0,64 bzw. 0,82 % $\pm$ 0,43. Bei Gruppe VI und VII stieg der Markierungsindex wieder auf 1,85 % $\pm$ 1,20 und 1,91 % $\pm$ 1,16.

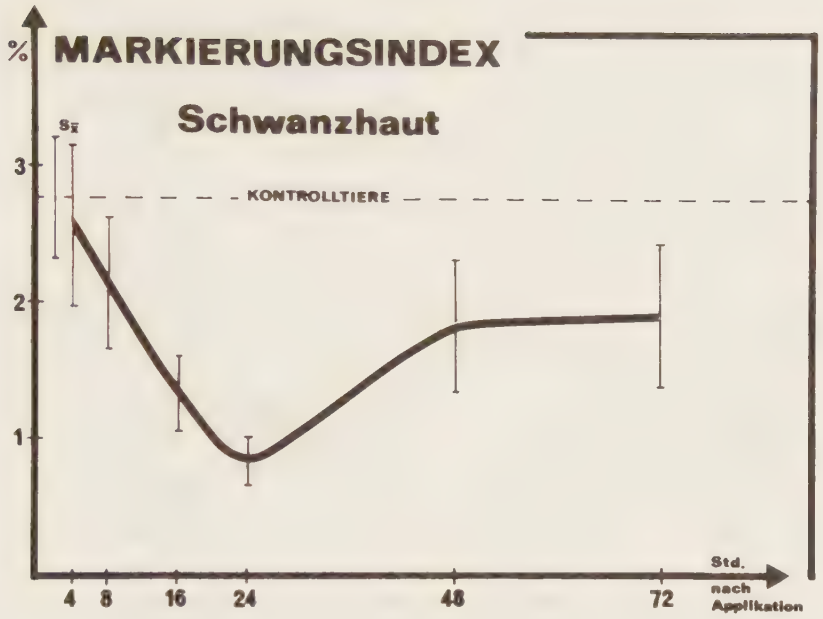


Abb. 2

Im einzelnen ergaben sich folgende Befunde:

	Kontrollgruppe I:	
Tier	0/1	3,0 %
"	0/2	0,8 %
"	0/3	3,65 %
"	0/4	2,8 %
"	0/5	2,5 %
"	0/6	3,8 %
$\bar{x}$ = 2,76		s = 1,08

Gruppe II:
(4 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	4/1	5,3 %
"	4/2	2,7 %
"	4/3	2,25 %
"	4/4	1,7 %
"	4/5	2,3 %
"	4/6	1,15 %

$\bar{x}$ = 2,57 s = 1,44

Gruppe III:
(8 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	8/1	0,75 %
"	8/2	2,0 %
"	8/3	1,6 %
"	8/4	3,6 %
"	8/5	2,65 %
"	8/6	keine Markierung!

$\bar{x}$ = 2,12 s = 1,08

Gruppe IV:
(16 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	16/1	0,9 %
"	16/2	2,25 %
"	16/3	1,15 %
"	16/4	1,0 %
"	16/5	2,0 %
"	16/6	0,7 %

$\bar{x}$ = 1,33 s = 0,64

Gruppe V:
(24 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	24/1	0,75 %
"	24/2	0,6 %
"	24/3	1,0 %
"	24/4	0,4 %
"	24/5	0,55 %
"	24/6	1,6 %

$\bar{x}$ = 0,82 s = 0,43

Gruppe VI:
(48 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	48/1	3,8 %
"	48/2	0,4 %
"	48/3	2,25 %
"	48/4	1,7 %
"	48/5	0,85 %
"	48/6	2,1 %

$\bar{x}$ = 1,85 s = 1,20

Gruppe VII:
(72 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	72/1	1,3 %
"	72/2	1,9 %
"	72/3	keine Markierung!
"	72/4	3,9 %
"	72/5	1,05 %
"	72/6	1,4 %

$\bar{x}$ = 1,91 s = 1,16

3.1.2.2. Mathematisch-statistische Auswertung (Tab. 2)

Zeitraum nach BLM-Applikation	4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h	
	+	++	++	++			Dunnett-Test
		(+)		+			multipler t-Test
			+	+			multipler U-Test

(bezügl. der Symbole siehe Seite 9)

Die 4h-Werte unterscheiden sich auf dem 0,05 (zweiseitigen) Niveau im Dunnett-Test von den übrigen Werten einschließlich den Kontrollwerten. Die 8h-Werte unterscheiden sich auf dem zweiseitigen 0,01 Niveau von den Kontrollwerten. Für die 4h und 8h-Werte ergab sich in den Kontroll-Testen kein signifikanter Unterschied auf dem 0,01 Niveau, sodaß die Ergebnisse des Dunnett-Testes nur unter Vorbehalt zu werten sind.
Die 16h und 24h-Werte unterscheiden sich von den Kontrollwerten nach dem Dunnett-Test auf dem 0,01 (zweiseitigen) Niveau, d.h. mit 99%iger Sicherheit beruhen die Unterschiede nicht auf Zufall.

3.1.3. Plattenepithel-Zunge

3.1.3.1. Befunde:

Bei Gruppe I (unbehandelte Tiere) ermittelten wir einen Markierungsindex von 17,53 % $\pm$ 5,46. Der

Mittelwert dieser Größe bei Gruppe II betrug 9,6 % ± 3,50. Bei Gruppe III und IV sank er auf 8,84 % ± 2,67 und 2,2 % ± 0,85. Wir beobachteten einen Anstieg auf 5,76 % ± 3,30 bei Gruppe V, auf 14,73 % ± 2,93 bei Gruppe VI und auf 18,24 % ± 2,41 bei Gruppe VII (Abb. 3).

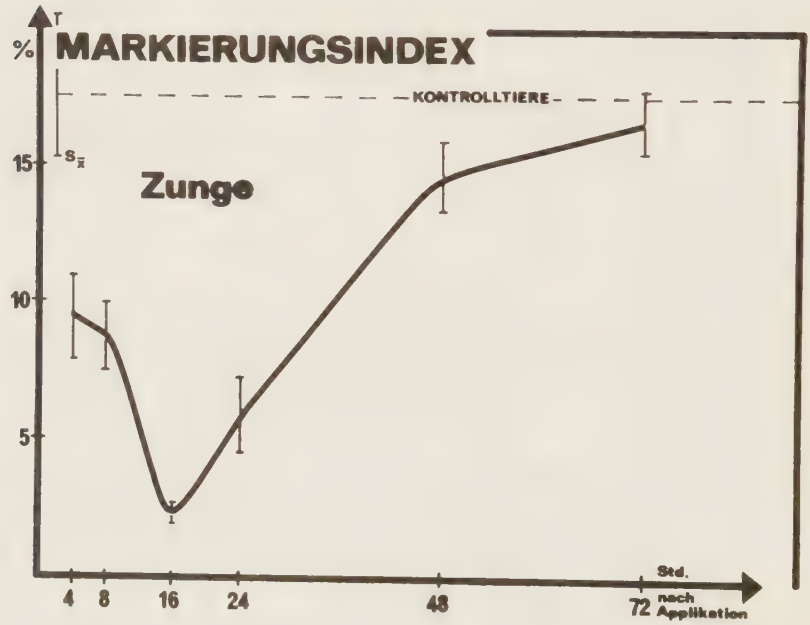


Abb. 3

Im einzelnen:

Kontrollgruppe I:

Tier	0/1	19,2 %
"	0/2	23,5 %
"	0/3	21,05 %
"	0/4	19,3 %
"	0/5	8,65 %
"	0/6	13,5 %

$\bar{x}$ = 17,53 s = 5,46

Gruppe II:
(4 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	4/1	11,6 %
"	4/2	12,7 %
"	4/3	6,9 %
"	4/4	13,5 %
"	4/5	4,8 %
"	4/6	8,1 %

$\bar{x}$ = 9,6 s = 3,50

Gruppe III:
(8 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	8/1	10,1 %
"	8/2	8,1 %
"	8/3	4,5 %
"	8/4	10,4 %
"	8/5	11,1 %
"	8/6	keine Markierung!

$\bar{x}$ = 8,84 s = 2,67

Gruppe IV:
(16 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	16/1	2,7 %
"	16/2	2,6 %
"	16/3	0,6 %
"	16/4	1,9 %
"	16/5	2,8 %
"	16/6	2,6 %

$\bar{x}$ = 2,2 s = 0,85

Gruppe V:
(24 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	24/1	11,0 %
"	24/2	8,2 %
"	24/3	2,4 %
"	24/4	5,5 %
"	24/5	2,9 %
"	24/6	4,6 %

$\bar{x}$ = 5,76 s = 3,30

Gruppe VI: (48 Stunden nach BLM-Applikation)		Gruppe VII: (72 Stunden nach BLM-Applikation)	
Tier 48/1	16,45 %	Tier 72/1	15,9 %
" 48/2	11,4 %	" 72/2	17,2 %
" 48/3	11,2 %	" 72/3	keine Markierung!
" 48/4	14,25 %	" 72/4	16,5 %
" 48/5	17,3 %	" 72/5	21,3 %
" 48/6	17,8 %	" 72/6	20,3 %
$\bar{x}$ = 14,73	s = 2,93	$\bar{x}$ = 18,24	s = 2,41

3.1.3.2. Mathematisch-statistische Auswertung (Tab. 3)

Zeitraum nach BLM-Applikation

4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h	
++	++	++	++			Dunnett-Test
(+)	+	+	+			multipler t-Test
		+	+			multipler U-Test

(bezügl. der Symbole siehe S. 9)

Der im Dunnett-Test gefundene Unterschied auf dem zweiseitigen 0,01 Niveau für die 4h-Werte muß mit Vorbehalt betrachtet werden, da in den Kontrolltesten keine 99 % Sicherheit für einen echten Unterschied gefunden wurde. Dagegen läßt sich für die 8h-Werte, die 16h-Werte und die 24h-Werte ein signifikanter Unterschied auf dem zweiseitigen 0,01 Niveau angeben.

3.1.4. Plattenepithel-Oesophagus

3.1.4.1. Befunde:

Nach Auszählen der markierten Zellen auf 2000 Zellen in der Basalschicht errechnete sich für die Kontrolltiere der Gruppe I der Markierungsindex von 13,19 % ± 3,85. Bei Gruppe II dagegen lag diese Größe um 9,2 % ± 3,93. Eine weitere Abnahme erfuhr dieser Wert bei Gruppe III, 4,9 % ± 1,05 und bei Gruppe IV, 1,6 % ± 2,12. Der Markierungsindex der Gruppe V lag mit 4,33 % ± 1,80 wieder darüber. Diese steigende Tendenz hielt bei Gruppe VI mit 8,29 % ± 1,64 weiter an. Der Wert der Gruppe VII mit 11,75 % ± 3,59 lag wieder nahe an dem der Kontrolltiere (Abb.4).

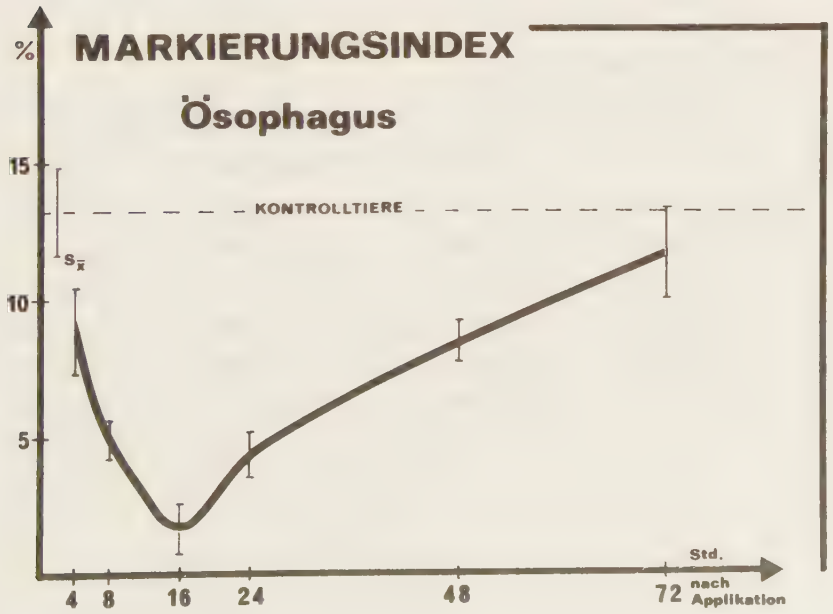


Abb. 4

Im einzelnen:

Kontrollgruppe I:

Tier	0/1	20,35 %
"	0/2	10,02 %
"	0/3	12,10 %
"	0/4	14,45 %
"	0/5	11,96 %
"	0/6	10,30 %

$\bar{x}$ = 13,19 s = 3,85

Gruppe II:
(4 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	4/1	14,4 %
"	4/2	12,5 %
"	4/3	6,6 %
"	4/4	10,9 %
"	4/5	6,6 %
"	4/6	4,4 %

$\bar{x}$ = 9,2 s = 3,93

Gruppe III:
(8 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	8/1	5,1 %
"	8/2	4,0 %
"	8/3	6,4 %
"	8/4	3,8 %
"	8/5	5,2 %
"	8/6	nicht markiert!

$\bar{x}$ = 4,9 s = 1,05

Gruppe IV:
(16 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	16/1	1,95 %
"	16/2	5,75 %
"	16/3	0,5 %
"	16/4	0,45 %
"	16/5	0,6 %
"	16/6	0,35 %

$\bar{x}$ = 1,6 s = 2,12

Gruppe V:
(24 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	24/1	4,65 %
"	24/2	6,0 %
"	24/3	3,15 %
"	24/4	6,3 %
"	24/5	1,5 %
"	24/6	4,4 %

$\bar{x}$ = 4,33 s = 1,80

Gruppe VI: (48 Stunden nach BLM-Applikation)		Gruppe VII: (72 Stunden nach BLM-Applikation)	
Tier	48/1 10,35 %	Tier	72/1 11,35 %
"	48/2 6,5 %	"	72/2 15,4 %
"	48/3 6,5 %	"	72/3 nicht markiert!
"	48/4 8,6 %	"	72/4 12,25 %
"	48/5 7,9 %	"	72/5 13,8 %
"	48/6 9,9 %	"	72/6 5,95 %
$\bar{x}$ = 8,29	s = 1,64	$\bar{x}$ = 11,75	s = 3,59

3.1.4.2. Mathematisch-statistische Auswertung (Tab. 4)

Zeitraum nach BLM-Applikation

4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h	
+	++	++	++	+		Dunnett-Test
	+	+	+			multipler t-Test
	+	+	+			multipler U-Test

(Bezügl. der Symbole siehe Seite 9)

Mit 99%iger Sicherheit fand sich ein echter Unterschied 8,16 und 24 Stunden nach Bleomycin^{R}-Applikation auf dem zweiseitigen 0,01-Niveau. Der signifikante Unterschied auf dem zweiseitigen 0,05-Niveau im Dunnett-Test für Gruppe II und Gruppe VI konnte in den anderen Testen nicht bestätigt und muß deshalb unter Vorbehalt betrachtet werden.

3.1.5. Schleimhaut-Drüsenmagen

3.1.5.1. Befunde:

Die Auszählung der Gruppe I (unbehandelte Tiere) lieferte uns einen Markierungsindex von 7,1 % ± 1,80. 4,3 % ± 0,76 der ausgezählten Zellen bei den Tieren der Gruppe II konnten markiert gefunden werden. Mit einem Index von 3,82 % ± 2,44 bei der Gruppe III fand sich eine noch geringere Markierungsdichte, 7,77 % ± 1,04 bzw. 7,77 % ± 1,57 der gezählten Zellkerne bei Gruppe IV und V 7,0 % ± 1,30 bei Gruppe VI und 8,21 % ± 2,60 bei der Gruppe VII waren mit 10 und mehr Silberkörnern belegt (Abb. 5).

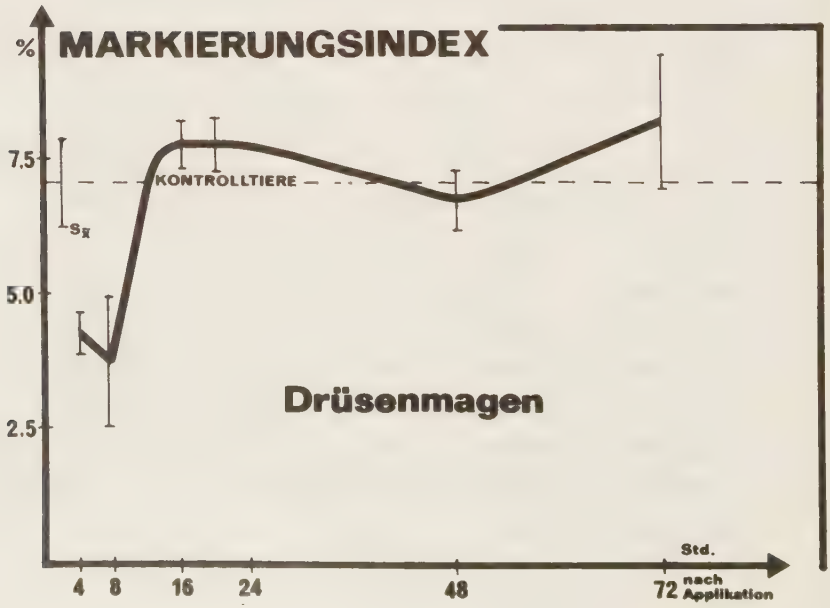


Abb. 5

Im einzelnen:

Kontrollgruppe I:

Tier	0/1	9,11 %
"	0/2	5,13 %
"	0/3	8,75 %
"	0/4	6,69 %
"	0/5	5,64 %
"	0/6	--

$\bar{x}$ = 7,1 s = 1,80

Gruppe II:
(4 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	4/1	4,06 %
"	4/2	3,5 %
"	4/3	5,52 %
"	4/4	3,97 %
"	4/5	--
"	4/6	4,44 %

$\bar{x}$ = 4,3 s = 0,76

Gruppe III:
(8 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	8/1	1,87 %
"	8/2	2,35 %
"	8/3	7,26 %
"	8/4	3,8 %
"	8/5	--
"	8/6	nicht markiert!

$\bar{x}$ = 3,82 s = 2,44

Gruppe IV:
(16 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	16/1	7,8 %
"	16/2	8,33 %
"	16/3	6,6 %
"	16/4	7,35 %
"	16/5	9,5 %
"	16/6	7,01 %

$\bar{x}$ = 7,77 s = 1,04

Gruppe V:
(24 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	24/1	7,06 %
"	24/2	10,24 %
"	24/3	7,86 %
"	24/4	7,72 %
"	24/5	5,96 %
"	24/6	--

$\bar{x}$ = 7,77 s = 1,57

(- - = nicht auswertbar)

Gruppe VI: (48 Stunden nach BLM-Applikation)		Gruppe VII: (72 Stunden nach BLM-Applikation)	
Tier 48/1	6,8 %	Tier 72/1	10,19 %
" 48/2	9,26 %	" 72/2	10,61 %
" 48/3	6,66 %	" 72/3	--
" 48/4	6,2 %	" 72/4	--
" 48/5	6,07 %	" 72/5	6,72 %
" 48/6	--	" 72/6	5,31 %
$\bar{x}$ = 7,0	s = 1,30	$\bar{x}$ = 8,21	s = 2,60

3.1.5.2. Mathematisch-statistische Auswertung (Tab. 5)

Zeitraum nach BLM-Applikation

4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h	
	+	+				Dunnett-Test
						multipler t-Test
	(+)					multipler U-Test

(Bezügl. der Symbole siehe Seite 9 .)

Im Dunnett-Test ergab sich damit eine signifikante Abweichung auf dem zweiseitigen 0,05-Niveau bei Gruppe III und IV, wobei der Wert für Gruppe IV keine Bestätigung in einem der Kontrollteste erfuhr.

3.1.6. Dünndarmschleimhaut-Ileum

3.1.6.1. Befunde:

Als Markierungsindex ergaben sich 26,92 % ± 4,15 für die Schleimhaut des unbehandelten Kollektivs der Gruppe I. Bei den Tieren der Gruppe II lag dieser Wert bei 25,76 % ± 3,12. Mit 17,2 % ± 1,02 bei Gruppe III und 20,4 % ± 2,73 bei Gruppe IV fanden sich weitere unter dem Niveau der unbehandelten Tiere liegende Werte. Der Markierungsindex der Gruppe V, 30,18 % ± 2,60, deutet eine "overshoot-reaction" auf die BLM-Behandlung an. Gruppe VI: 32,5 % ± 5,09. Schließlich konnten wir bei Gruppe VII wieder einen Wert um 22,9 % ± 2,59 berechnen (Abb.6).

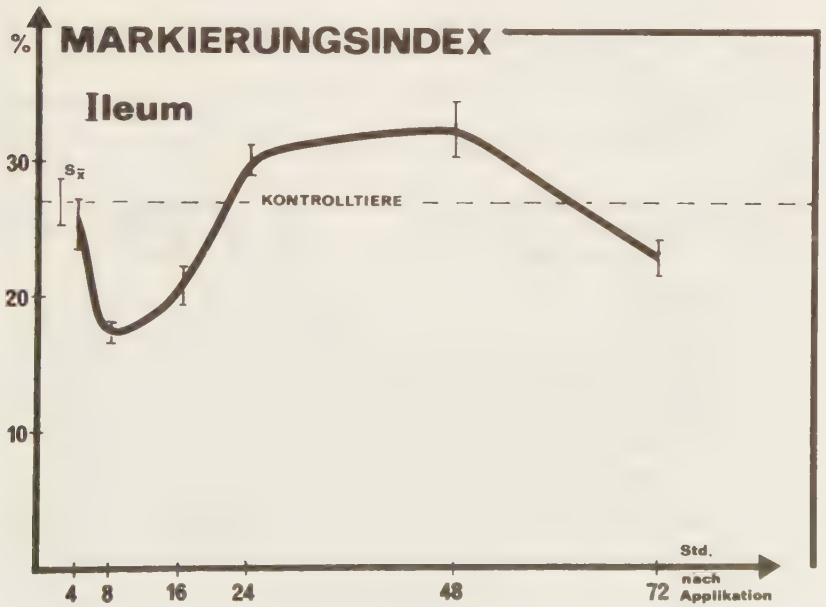


Abb. 6

Im einzelnen:

Kontrollgruppe I:

Tier	0/1	30,5 %
"	0/2	20,2 %
"	0/3	25,3 %
"	0/4	28,5 %
"	0/5	25,5 %
"	0/6	31,5 %

$\bar{x}$ = 26,92 s = 4,15

Gruppe II:
(4 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	4/1	29,4 %
"	4/2	27,2 %
"	4/3	26,3 %
"	4/4	21,0 %
"	4/5	--
"	4/6	24,9 %

$\bar{x}$ = 25,76 s = 3,12

Gruppe III:
(8 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	8/1	--
"	8/2	--
"	8/3	16,3 %
"	8/4	17,0 %
"	8/5	18,3 %
"	8/6	nicht markiert!

$\bar{x}$ = 17,2 s = 1,02

Gruppe IV:
(16 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	16/1	19,1 %
"	16/2	--
"	16/3	--
"	16/4	17,2 %
"	16/5	22,3 %
"	16/6	23,0 %

$\bar{x}$ = 20,4 s = 2,73

Gruppe V:
(24 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	24/1	29,2 %
"	24/2	30,8 %
"	24/3	31,6 %
"	24/4	25,4 %
"	24/5	31,5 %
"	24/6	32,6 %

$\bar{x}$ = 30,18 s = 2,60

Gruppe VI: (48 Stunden nach BLM-Applikation)		Gruppe VII: (72 Stunden nach BLM-Applikation)	
Tier 48/1	40,0 %	Tier 72/1	27,3 %
" 48/2	25,0 %	" 72/2	22,8 %
" 48/3	34,7 %	" 72/3	nicht markiert!
" 48/4	33,3 %	" 72/4	21,2 %
" 48/5	32,9 %	" 72/5	22,4 %
" 48/6	29,1 %	" 72/6	20,8 %
$\bar{x}$ = 32,5	s = 5,09	$\bar{x}$ = 22,9	s = 2,59

3.1.6.2. Mathematisch-statistische Auswertung (Tab. 6)

Zeitraum nach BLM-Applikation

4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h	
	++	+		+		Dunnett-Test
	+					multipler t-Test
						multipler U-Test

(Bezügl. der Symbole siehe Seite 9 .)

Mit 99%iger Sicherheit besteht ein Unterschied zwischen dem Mittelwert der Kontrollgruppe und dem Mittelwert der Gruppe III (bei Bestätigung im multiplen t-Test). In Gruppe IV und VI ergibt sich eine signifikante Abweichung im Dunnett-Test auf dem zweiseitigen 0,05-Niveau bei fehlender Signifikanz in den Kontroll-Testen.

3.1.7. Dickdarmschleimhaut

3.1.7.1. Befunde:

Der Ausgangswert für den Markierungsindex in der Colonschleimhaut lag bei Gruppe I, dem unbehandelten Kollektiv, bei 8,33 % ± 2,69. Knapp darunter, mit 7,19 % ± 1,56 fand sich der Wert für die Gruppe II. 8 Stunden nach Behandlung mit 20mg/Kg Körpergewicht BLM sank dieser Index auf 3,29 % ± 1,09. Den niedrigsten Wert mit 2,86 % ± 0,89 beobachteten wir bei Gruppe IV. Bei Gruppe V mit 5,63 % ± 1,19 zeichnete sich bereits die Erholung ab. Der Index für Gruppe VI mit 9,44 % ± 1,94 und der der Gruppe VII mit 10,18 % ± 2,54 war dann schon höher als bei dem Kontroll-Kollektiv der Gruppe I (Abb. 7).

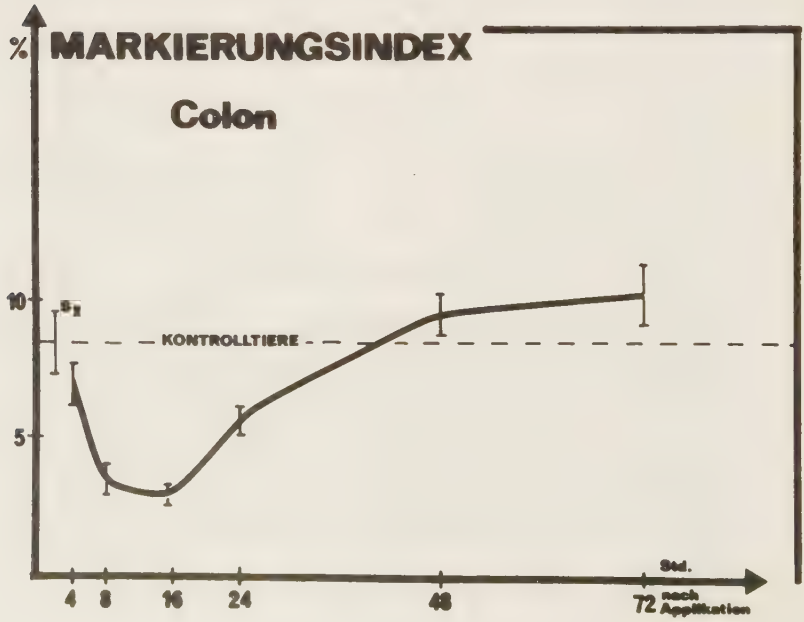


Abb. 7

Im einzelnen:

Kontrollgruppe I:

Tier	0/1	10,2 %
"	0/2	3,14 %
"	0/3	9,2 %
"	0/4	8,7 %
"	0/5	8,25 %
"	0/6	10,5 %

$\bar{x}$ = 8,33 s = 2,69

Gruppe II:
(4 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	4/1	7,05 %
"	4/2	7,5 %
"	4/3	4,2 %
"	4/4	8,6 %
"	4/5	8,1 %
"	4/6	7,7 %

$\bar{x}$ = 7,19 s = 1,56

Gruppe III:
(8 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	8/1	4,5 %
"	8/2	3,65 %
"	8/3	2,0 %
"	8/4	4,0 %
"	8/5	2,3 %
"	8/6	nicht markiert!

$\bar{x}$ = 3,29 s = 1,09

Gruppe IV:
(16 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	16/1	3,1 %
"	16/2	2,34 %
"	16/3	3,6 %
"	16/4	2,2 %
"	16/5	4,1 %
"	16/6	1,8 %

$\bar{x}$ = 2,86 s = 0,89

Gruppe V:
(24 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	24/1	4,75 %
"	24/2	4,0 %
"	24/3	7,0 %
"	24/4	6,3 %
"	24/5	6,65 %
"	24/6	5,1 %

$\bar{x}$ = 5,63 s = 1,19

Gruppe VI: (48 Stunden nach BLM-Applikation)		Gruppe VII: (72 Stunden nach BLM-Applikation)	
Tier 48/1	8,95 %	Tier 72/1	13,9 %
" 48/2	10,8 %	" 72/2	11,3 %
" 48/3	7,2 %	" 72/3	nicht markiert!
" 48/4	9,3 %	" 72/4	7,6 %
" 48/5	7,9 %	" 72/5	8,2 %
" 48/6	12,5 %	" 72/6	9,9 %
$\bar{x}$ = 9,44	s = 1,94	$\bar{x}$ = 10,18	s = 2,54

3.1.7.2. Mathematisch-statistische Auswertung: (Tab. 7)

Zeitraum nach BLM-Applikation

4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h	
	++	++	+			Dunnett-Test
	+	+				multipler t-Test
	+					multipler U-Test

(Bezügl. der Symbole siehe Seite 9 .)

Im Dunnett-Test ergab sich eine signifikante Abweichung für die Gruppe III und IV auf dem 0,01-Niveau und für Gruppe V auf dem 0,05-Niveau. Für Gruppe III und IV fanden die Ergebnisse eine Bestätigung in den Kontroll-Testen.

3.1.8. Übergangsepithel-Harnblase

3.1.8.1. Befunde:

Beim Übergangsepithel der Harnblase war der Markierungsindex bei der unbehandelten Gruppe I 0,19 % ± 0,11 und bei der Gruppe II 4 Stunden nach BLM-Applikation 0,08 % ± 0,03. Ab Gruppe III fand sich dann überraschenderweise ein fortlaufender Anstieg bis zur Gruppe V. (III: 0,26 % ± 0,17; IV: 1,24 % ± 0,87; V: 3,38 % ± 4,12). Ab Gruppe VI sank der Markierungsindex auf 1,88 % ± 1,49 und auf 0,53 % ± 0,49 bei Gruppe VII (Abb. 8).

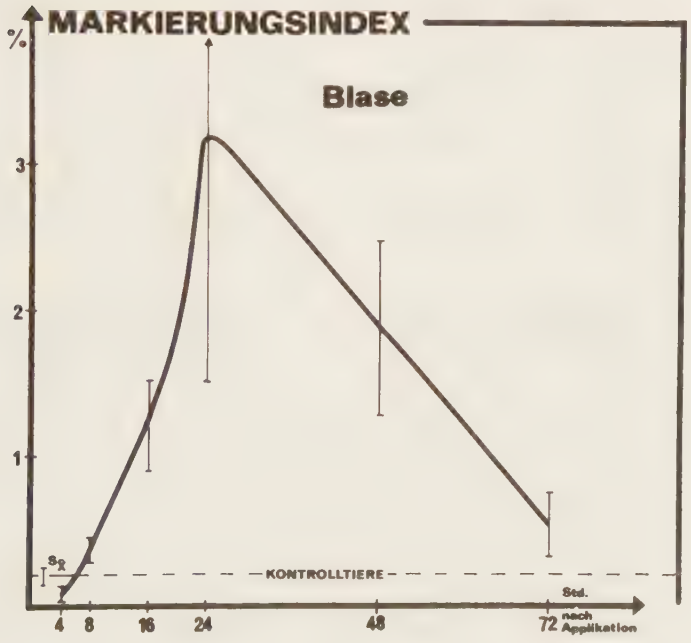


Abb. 8

Im einzelnen:

Kontrollgruppe I:

Tier	0/1	0,15 %
"	0/2	0,1 %
"	0/3	0,2 %
"	0/4	0,4 %
"	0/5	0,2 %
"	0/6	0,1 %
$\bar{x}$ = 0,19		s = 0,11

Gruppe II:
(4 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	4/1	0,05 %
"	4/2	0,1 %
"	4/3	0,05 %
"	4/4	0,1 %
"	4/5	0,05 %
"	4/6	0,1 %
$\bar{x}$ = 0,08		s = 0,03

Gruppe III:
(8 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	8/1	0,15 %
"	8/2	0,05 %
"	8/3	0,3 %
"	8/4	0,3 %
"	8/5	0,5 %
"	8/6	nicht markiert!
$\bar{x}$ = 0,26		s = 0,17

Gruppe IV:
(16 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	16/1	0,1 %
"	16/2	0,3 %
"	16/3	1,25 %
"	16/4	2,15 %
"	16/5	2,0 %
"	16/6	1,65 %
$\bar{x}$ = 1,24		s = 0,87

Gruppe V:
(24 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	24/1	11,0 %
"	24/2	0,05 %
"	24/3	1,0 %
"	24/4	3,9 %
"	24/5	4,0 %
"	24/6	0,3 %
$\bar{x}$ = 3,38		s = 4,12

Gruppe VI: (48 Stunden nach BLM-Applikation)		Gruppe VII: (72 Stunden nach BLM-Applikation)	
Tier 48/1	4,6 %	Tier 72/1	0,35 %
" 48/2	2,5 %	" 72/2	0,3 %
" 48/3	0,65 %	" 72/3	nicht markiert!
" 48/4	0,9 %	" 72/4	0,3 %
" 48/5	1,6 %	" 72/5	1,4 %
" 48/6	1,05 %	" 72/6	0,3 %
$\bar{x}$ = 1,88	s = 1,49	$\bar{x}$ = 0,53	s = 0,49

3.1.8.2. Mathematisch-statistische Auswertung: (Tab. 8)

Zeitraum nach BLM-Applikation

4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h	
			+			Dunnett-Test
						multipler t-Test
				+	(+)	multipler U-Test

(Bezügl. der Symbole siehe Seite 9 .)

Nach dem Dunnett-Test besteht ein signifikanter Unterschied auf dem zweiseitigen 0,05-Niveau ohne Bestätigung in den Kontrolltesten bei Gruppe V. Daneben findet sich in Gruppe VI im multiplen u-Test eine signifikante Abweichung auf dem zweiseitigen 0,01-Niveau sowie bei Gruppe VII auf dem zweiseitigen 0,02-Niveau.

3.1.9. Übergangsepithel-Nierenbecken

3.1.9.1. Befunde:

Der Markierungsindex der Gruppe I belief sich im Mittel auf 0,34 % ± 0,11. 0,50 % ± 0,13 Zellkerne waren im Durchschnitt bei Gruppe II markiert. Der Index für Gruppe III lag bei 0,24 % ± 0,07, für Gruppe IV bei 0,64 % ± 0,29. Deutlich stieg er bei Gruppe V, 24 Stunden nach BLM-Applikation, auf 1,53 % ± 0,68 und bei Gruppe VI auf 1,76 % ± 0,86 an. Die Gruppe VII dagegen lag mit einem Index von 0,52 % ± 0,06 wieder nahe dem Wert der Grupp I (Abb. 9).

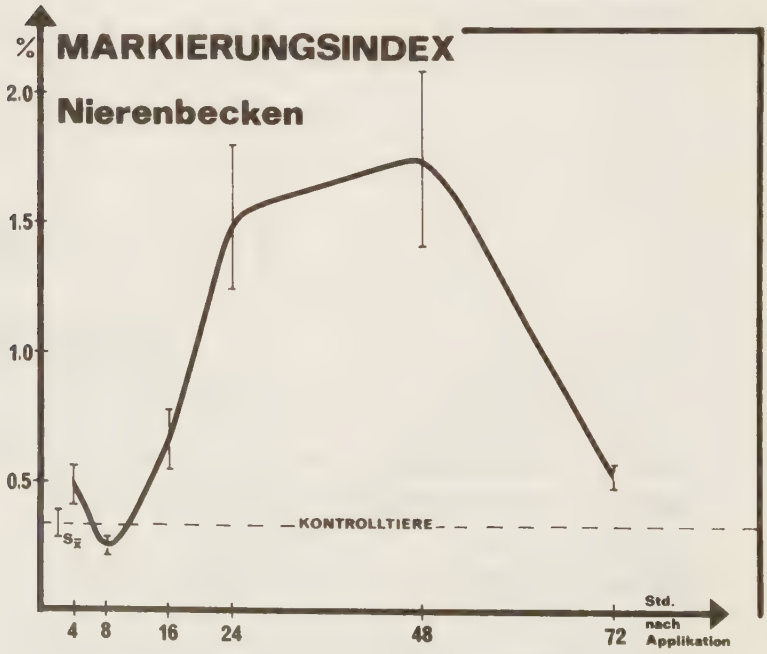


Abb. 9

Im einzelnen:

Kontrollgruppe I:

Tier	0/1	0,2 %
"	0/2	0,4 %
"	0/3	0,3 %
"	0/4	0,25 %
"	0/5	0,4 %
"	0/6	0,5 %

$\bar{x}$ = 0,34 s = 0,11

Gruppe II:
(4 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	4/1	--
"	4/2	--
"	4/3	0,65 %
"	4/4	0,45 %
"	4/5	0,4 %
"	4/6	--

$\bar{x}$ = 0,50 s = 0,13

Gruppe III:
(8 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	8/1	0,2 %
"	8/2	0,2 %
"	8/3	0,25 %
"	8/4	0,35 %
"	8/5	0,2 %
"	8/6	nicht markiert!

$\bar{x}$ = 0,24 s = 0,07

Gruppe VI:
(16 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	16/1	0,3 %
"	16/2	0,85 %
"	16/3	0,55 %
"	16/4	0,8 %
"	16/5	1,0 %
"	16/6	0,35 %

$\bar{x}$ = 0,64 s = 0,29

Gruppe V:
(24 Stunden nach BLM-Applikation)

Tier	24/1	1,45 %
"	24/2	0,9 %
"	24/3	0,75 %
"	24/4	1,45 %
"	24/5	2,5 %
"	24/6	2,1 %

$\bar{x}$ = 1,53 s = 0,68

Gruppe VI: (48 Stunden nach BLM-Applikation)		Gruppe VII: (72 Stunden nach BLM-Applikation)	
Tier 48/1	1,05 %	Tier 72/1	0,5 %
" 48/2	1,5 %	" 72/2	0,5 %
" 48/3	1,1 %	" 72/3	nicht markiert!
" 48/4	1,3 %	" 72/4	0,55 %
" 48/5	2,4 %	" 72/5	0,45 %
" 48/6	3,2 %	" 72/6	0,6 %
$\bar{x}$ = 1,76	s = 0,86	$\bar{x}$ = 0,52	s = 0,06

3.1.9.2. Mathematisch-statistische Auswertung: (Tab. 9)

Zeitraum nach BLM-Applikation

4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h	
			++	++		Dunnett-Test
			+	+	+	multipler t-Test
			+	+	(+)	multipler U-Test

(Bezügl. der Symbole siehe Seite 9 .)

Nach dem Dunnett-Test fand sich ein signifikanter, in den Kontroll-Testen bestätigter Unterschied auf dem zweiseitigen 0,01-Niveau für Gruppe V und VI. Außerdem wurde für Gruppe VII ein Unterschied auf dem zweiseitigen 0,01-Niveau im multiplen t-Test bzw. auf dem 0,02-Niveau im multiplen u-Test gefunden.

3.2. Zur Lokalisations-spezifischen Wirkung von Bleomycin^{R}:

Bei der Untersuchung der Frage, ob Bleomycin^{R} auf eine Zellpopulation mit bestimmter Lokalisation signifikant stärker oder schwächer als an einer anderen Stelle im Organismus wirkt, ist zu berücksichtigen, daß die bei allen Versuchstieren an 9 definierten Lokalisationen gewonnenen Stichproben möglicherweise voneinander abhängig sind. Deshalb wurde der Vergleich der Markierungs-Indices der einzelnen Gewebe bzw. Zellpopulationen für jedes Tier einzeln durchgeführt. Die Resultate dieses Vergleichs wurden dann den Tests unterworfen.

Es ist angemessen, "Hemmwirkung" nicht als additiv sondern multiplikativ zu definieren.

Beispiel: Wenn bei einem Tier der Kontrollgruppe ein Markierungsindex von 10 % an der Zunge und ein Markierungsindex von 16 % an der Fußhaut gefunden wird, und bei den entsprechenden Untersuchungsproben eines unbehandelten Tieres der Markierungs-Index 5 % bzw. 8 % beträgt, so wird man keinen Anhalt für eine spezifische Wirkung der Substanz auf einen der beiden Loci sehen. In beiden Fällen ist die Zahl der DNS-synthetisierenden Zellen um die Hälfte zurückgegangen.
Der Quotient der Markierungs-Indices ist bei beiden Tieren der gleiche (10:16=5:8).

(Im additiven Modell wird dagegen eine Abnahme des Markierungs-Indexes von einmal 5 % einer Abnahme von 8 % gegenübergestellt).

Daher wurde als Maß $m_{01,02}$ für das Verhältnis der Markierungs-Indices bei Gewebe bzw. Zellpopulationen bei einem Tier der Quotient der Markierungs-Indices gewählt:

$$MIQ = m_{01,02} = \frac{MI_{01}}{MI_{02}}$$

So erhält man für jedes Tier, an dem die entsprechenden Messungen erfolgreich waren, mehrere MIQ's, so zum Beispiel einen Nierenbecken-Blasen-MIQ. Wäre dieser 8 Stunden nach Behandlung höher als bei der Kontrollgruppe, sind folgende Möglichkeiten offen:

a) der Markierungs-Index der Blase ist im Vergleich zu dem des Nierenbeckens stärker gefallen (kleinerer Nenner im Quotienten)
b) der Markierungs-Index des Nierenbeckens ist stärker gestiegen (deutlich vergrößerter Zähler im Bruch)
c) steigender Markierungs-Index beim Nierenbecken bei fallendem Markierungs-Index in der Blase.

Welche dieser 3 Möglichkeiten zutrifft, ist anhand der Kurvenverläufe zu entscheiden.
Als Quotient von binominal- bzw. angenähert normalverteilten Größen ist der MIQ nicht normalverteilt. Deshalb müssen entweder parameterfreie Tests verwendet werden oder die MIQ-Werte zunächst logarithmiert werden, wodurch multiplikative ("spezifische") Unterschiede in additive umgewandelt werden. Dabei sind natürlich auch die Logarithmen der MIQ-Werte nicht normalverteilt, und man muß auf die Robustheit des Dunnett-Tests vertrauen.

3.2.1. Vergleich der Bleomycin^{R}-Wirkung auf Plattenepithelverbände verschiedener Lokalisation:

Auf die detaillierte Wiedergabe der einzelnen Ausrechnungen wird verzichtet. Letztendlich erbrachte die

m a t h e m a t i s c h - s t a t i s t i s c h e A u s w e r t u n g

das in Abb. 10 dargestellte Ergebnis:

	PLATTENEPITHELIEN					
GRUPPE	Z/O	Z/F	Z/S	O/F	O/S	F/S
I – II						
I – III						
I – IV		▲▲ ●	▲▲▲	▲▲ ●	▲▲	
I – V						
I – VI						
I – VII						

Abb. 10

Symbole

Z = Abkürzung für Zungenepithel in den Tabellen

O = " für Oesophagusepithel

F = " für Epidermis der Fußhaut

S = " für Epidermis der Schwanzhaut

Z/O bedeutet dann Vergleich Zunge : Oesophagus, usw.

Multipler U-Test:

◉ = 0,01 - zweiseitig signifikante Abweichung

◎ = 0,02 - " " "

Dunnett-Test:

▲▲= 0,01 - zweiseitig die ganze Spalte

▲ = 0,05 - " " " "

Dies bedeutet:

1.) Vergleicht man die Bleomycin^{R}-Wirkung auf das Oberflächenepithel der Zunge mit der Wirkung auf die Oesophagus-auskleidung, läßt sich kein signifikanter Unterschied während 72 Stunden nach einmaliger Applikation in der angegebenen Dosis feststellen.

2.) Auch der Vergleich zwischen der Wirkung auf die Epidermis des Fusses und des Schwanzes ergibt keinen signifikanten Unterschied auf allen untersuchten Zeitstufen.

3.) 16 h nach Applikation von Bleomycin^{R} unterscheiden sich die Wirkungen beim Vergleich Zunge : Fußhaut und Zunge : Schwanzhaut signifikant. Beidesmal ist die Wirkung auf das Zungenepithel stärker.

4.) 16 h nach Applikation von Bleomycin^{R} gilt für den Vergleich Oesophagus : Schwanzhaut und Oesophagus : Fußhaut Analoges, d.h. die Proliferationsaktivität des Plattenepithels der Speiseröhre ist durch Bleomycin^{R} stärker beeinträchtigt als die des Plattenepithels im Schwanz- oder Fußbereich.

Vergleich der Bleomycin^{R}-Wirkung auf Schleimhaut-epithelien und Übergangsepithelien verschiedener Lokalisation:

Die mathematisch-statistische Auswertung ergab schließlich das in Abb. 11 Dargestellte:

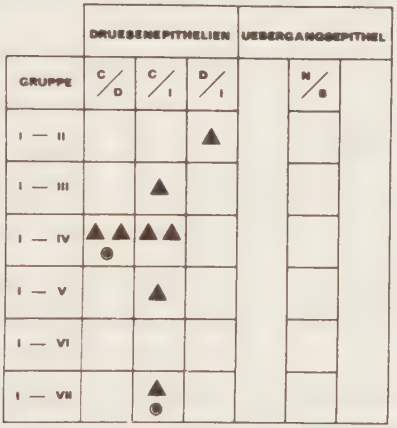


Abb. 11

C = Colon

I = Ileum

D = Drüsenmagen

C/D bedeutet Vergleich Colon : Drüsenmagen, usw.

N = Nierenbecken

B = Blase

N/B bedeutet Vergleich Nierenbecken : Blase

Multipler U-Test:

◉ = 0,01 - zweiseitig signifikante Abweichung

◉ = 0,02 - " " "

Dunnett-Test:

▲▲ = 0,01 - zweiseitig die ganze Spalte

▲ = 0,05 - " " " "

Dies bedeutet:

1.) Im Vergleich der Wirkung auf die Schleimhaut von Ileum und Colon werden signifikante Unterschiede nach 8 h (zweiseitig 0,05-Niveau), nach 16 h (0,01-Niveau, nach 24 h (0,05-Niveau) und nach 72 h (0,05-Niveau) im Dunnett-Test festgestellt. (Kontrollteste siehe Tabelle). Interessanterweise wirkt Bleomycin^{R} auf den Zeitstufen 8 h, 16 h und 24 h stärker hemmend auf das Colon, d.h. der Markierungs-Index sinkt in stärkerem Maße, während nach 72 h ein umgekehrtes Verhalten zu beobachten ist.

2.) Vergleicht man die Wirkung von Bleomycin^{R} auf den Drüsenmagen mit der Wirkung auf das Colon und in einem weiteren Test mit der Wirkung auf das Ileum, so findet sich im ersten Falle ein signifikanter Unterschied auf der 16 h-Zeitstufe; dort wirkt Bleomycin^{R} stärker auf die Schleimhaut des Colon und im zweiten Vergleich findet sich ein signifikanter Unterschied auf der 4 h-Zeitstufe, dort liegt eine stärkere "Hemmwirkung" von Bleomycin^{R} beim Drüsenmagen vor.

3.) Da signifikante Unterschiede im Vergleich Nierenbecken : Blasenschleimhaut fehlen, muß auf allen Zeitstufen ein gleichartiges und gleichgradiges Wirken von Bleomycin^{R} angenommen werden.

3.3. Zur Gewebsspezifität von Bleomycin^{R}

Es wurden histologisch verwandte Gewebe in Gruppen zusammengefaßt und miteinander verglichen.
Zur Analyse des Verhaltens von Gruppen mit histologisch verwandten Geweben zueinander (Gewebsverbände $O_1 \ldots O_k$ und $P_1 \ldots P_e$) wurde der Quotient der geometrischen Mittel der Markierungs-Indices beider Gruppen gewählt:

$$MIQ = m_{O1 \ldots O2;p1 \ldots p2} = \frac{(MI_{O1} \times MI_{O2} \times \ldots \times MI_{Ok})^{\frac{1}{k}}}{(MI_{p1} \times MI_{p2} \times \ldots \times MI_{pe})^{\frac{1}{e}}}$$

Analoges wie für die Interpretation von MIQ gilt für die Interpretation der MIQ der Gruppen histologisch verwandter Gewebe.
Die MIQ-Werte mußten analog den Ausführungen des vorigen Abschnittes (hinsichtlich der Lokalisationsspezifität) als multiplikative ("spezifische") Unterschiede durch Logarithmierung in additive Werte umgewandelt werden. Die Resultate dieser Umrechnung gingen in die Tests ein.

3.3.1. Vergleich der Bleomycin^{R}-Wirkung auf Plattenepithel-, Schleimhautepithel-, Übergangsepithel-Gruppen

M a t h e m a t i s c h - s t a t i s t i s c h e A u s w e r t u n g :

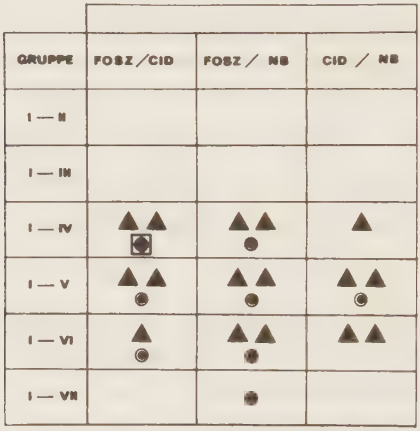


Abb. 12

FOSZ = Plattenepithelien (Fuß-Oesophagus-Schwanz-Zunge)
CID = Schleimhaut (Colon-Ileum-Drüsenmagen)
NB = Übergangsepithel. (Nierenbecken-Harnblase)

Multipler U-Test:

◉ = 0,01 - zweiseitig signifikante Abweichung
⦿ = 0,02 - " " "

Dunnett-Test:

▲▲ = 0,01 - zweiseitig die ganze Spalte
▲ = 0,05 - " " " "

Dies bedeutet:

1.) Beim Vergleich der Bleomycin^{R}-Wirkung auf die S c h l e i m h ä u t e (des Drüsenmagens, des Ileums und des Colons zusammen) mit der Bleomycin^{R}-Wirkung auf P l a t t e n e p i t h e l i e n (Fuß, Schwanzhaut, Oesophagus,

Zunge) fand sich eine signifikant stärkere Wirkung auf Plattenepithelien nach 16, 24 und 48 Stunden. Dabei lagen die Unterschiede nach 16 h und 24 h auf dem zweiseitigen 0,01-Niveau und nach 48 h auf dem zweiseitigen 0,05-Niveau im Dunnett-Test.
In den anderen Tests konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (siehe dazu Abb. 13).

2.) Vergleicht man die Übergangsepithelien (von Nierenbecken und Blase zusammen) mit den Plattenepithelien, läßt sich eine signifikante stärkere Hemmung bei Plattenepithelien (0,01-Niveau) nach 16, 24 und 48 h feststellen.

3.4. Bestätigung der Ergebnisse von 3.2. und 3.3. mittels parameterfreier Tests.

Für verschiedene Gruppen gleichen Umfangs existiert ein zum Dunnett-Test analoger parameterfreier Test (siehe Zar, S. 158 (34)). Die entsprechenden Ergebnisse zeigt Abb. 13, wobei leere Felder gleichen, schraffierte Felder unterschiedlichen Stichprobenumfängen entsprechen. In die schraffierten Felder sind zusätzlich die Ergebnisse des multiplen U-Tests aus den Abb. 10, 11 und 12 eingetragen.

	PLATTENEPITHEL						DRUESENEPITHEL				EPITHELARTEN		
Gruppe	Z/O	Z/F	Z/S	O/F	O/S	F/S	C/D	C/I	D/I	N/B	FOSZ/CID	FOSZ/NB	CID/NB
I - II			▲				▲		▲		▲		
I - III													
I - IV		▲▲	▲▲	▲▲	▲▲		●				(●)	▲▲	
I - V		▲		▲▲			▲				▲▲	▲▲	▲
I - VI											▲	▲▲	▲
I - VII								●				●	

Abb. 13

Zum DUNNETT-Test analoger parameterfreier Test:

▲▲ = 0,01 - zweiseitig signifikante Abweichung simultan für alle leeren Kästchen einer Spalte

▲ = 0,05 - zweiseitig signifikante Abweichung simultan für alle leeren Kästchen einer Spalte

Multipler U-Test:

● = 0,01 - zweiseitig signifikante Abweichung für das betreffende Kästchen

(●) = 0,02 - zweiseitig signifikante Abweichung für das betreffende Kästchen.

Dies bedeutet:

Alle Kästchen in jeder Spalte, die ein oder zwei ▲ beinhalten, entsprechen zugleich mit 95%iger Wahrscheinlichkeit wirklichen Mittelwertunterschieden.

Somit gelten die Ergebnisse von 3.2. und 3.3. auch in parameterfreien Tests als gesichert.

D I S K U S S I O N :

S c h r i f t t u m zu den G r u n d l a g e n der antineoplastischen Wirkung von Bleomycin^{R}

Nach dem bisher vorliegenden Schrifttum sind bei der antineoplastischen Wirkung von Bleomycin^{R} wesentliche Teilaspekte die Beeinträchtigung des Tumor-Wachstums durch

a) den Einfluß auf die DNS-Synthese;
b) die Änderung der Proliferationskinetik;
c) Fragmentierung von Chromosomen, Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNS und die Störung der "Repair-Mechanismen".

Über den Einfluß von Bleomycin^{R} auf die DNS-Synthese bzw. eine ^{3}H-Thymidin-Einbauhemmung in entsprechenden Versuchen ist Wesentliches berichtet worden von UMEZAWA et al. (1967 (30), E. coli und Hela-Zellen), COHEN (1972 (4), Dünndarm der Maus), WATANABE (1974 (33), L-Zellen der Maus), ANDREEFF (1975 (2), Ehrlich-Aszites-Tumor der Maus). NAGATSU et al. (1971 (19)) haben durch Mikrospektrophotometrie des Kern-DNS-Gehaltes beim VX-2 Karzinom des Kaninchens eine Hemmung der DNS-Synthese nach praemitotischem Block nachgewiesen. PETRES et al. (1976 (20)) fanden bei der Bestimmung des ^{14}C-Thymidineinbaus in stimulierte menschliche Lymphocyten mittels Szintillationszähler, Cytophotometrie und Autoradiographie eine Hemmung des ^{14}C-Einbaus unter Bleomycin^{R}-Einwirkung. MÜLLER et al. (1972, 1975 (16, 17 , 18)) wiesen eine Hemmung der DNS-Synthese in der Zellkultur von Mäuselymphomzellen und eine Hemmung der DNS-abhängigen-DNS-Polymerase bei onkogenen RNS-Viren nach.

Die Änderung der Proliferationskinetik einer Zellpopulation unter Bleomycin^{R}-Einwirkung haben verschiedene Autoren berichtet: Eine Arretierung der Zellen in der G_2-Phase haben BARRANCO et al. (1971 (3)) nach Registrierung von Überlebenskurven an asynchronen und synchronisierten CHO-Zellen angenommen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen COHEN et al. (1972 (4)) durch Mitosenaktivitäts-Bestimmungen im Duodenum der Maus und Einbaumessungen mit ^{3}H-Thymidin und Cytidin-5-^{3}H, ebenso MÜLLER (1977 (14)) durch Anwendung des "Markierten-Mitose-Verfahrens" am Mäusedarm und WATANABE (1974 (33)) durch Bestimmung der Mitosefrequenz in L-Zellkulturen und Autoradiographie. Eine Mitosehemmung stellten COHEN et al. (1972 (4)) fest, ebenso MIYAKI et al. (1974 (13)) durch Untersuchung des DNS-Membrankomplexes nach Lyse von AH-66 Zellen und AH-66 F Zellen, PROMCHAINANT (1975 (21)) durch Mitoseindexbestimmungen an menschlichen Leukozyten in der Kultur und MÜLLER (1977 (14)) durch Mitoseindexbestimmungen und autoradiographische Untersuchungen am Mäusedarm. SCHUMANN et al. (1974 (24)) beobachteten eine Arretierung der Zellen in (G_2+ M) durch Impulscytophotometrie an Einzelzellsuspensionen des Ehrlich-Aszites-Karzinoms der Maus, ANDREEFF (1975 (2)) - ebenfalls durch Cytophotometrie - dagegen eine Arretierung der Zellen in der späten S-Phase.

Die Fragmentierung von Chromosomen, DNS-Einzel- und Doppelstrangbrüche und Störung der DNS-"repair"-Mechanismen wurden diskutiert von TERASIMA et al. (1970 (27)), WATANABE et al. (1974 (33)), MIYAKI et al. (1974 (13)) und MÜLLER et al. (1975 (18)).

Zu den eigenen Untersuchungen:

Kriterium "Markierungsindex" für die Beurteilung der Bleomycin^R-Wirkung

Für den Vergleich der Bleomycin^R-Wirkung auf verschiedene Gewebe bzw. Zellpopulationen bei der Maus wurde von uns der Markierungsindex gewählt, damit die im Schrifttum diskutierten, in a) - c) genannten Bleomycin^R-Wirkungen (Beeinträchtigung der DNS-Synthese, Änderung der Proliferationskinetik, Wiederverwendung von DNS-Bruchstücken im Rahmen der "repair"-Mechanismen) q u a l i t a t i v miterfaßt werden. Der Markierungs-Index beschreibt das Verhältnis von markierten Zellen zur Gesamtzellzahl einer Zell-Population (in Prozent). Die Markierung erfolgt dabei über ^{3}H-Thymidin, das exogen zugeführt und in die neugebildete DNS eingebaut wird. Die Markierung wird im Histo-Autoradiogramm aus der Schwärzung der Fotoemulsions-Schicht über den Zellkernen festgestellt, die während der Verfügbarkeitszeit des ^{3}H-Thymidins DNS neu synthetisiert haben. Der Markierungs-Index ist somit ein relatives Maß für die Proliferations-Fähigkeit eines Gewebes.

Einfluß einer verminderten DNS-Syntheserate auf den Markierungs-Index:

Eine Verminderung der DNS-Synthese-Rate einer Zell-Population unter der Einwirkung einer Substanz ist möglich sowohl durch Reduktion der Z a h l aller DNS-synthetisierenden Zellen, als auch durch Beeinträchtigung der Q u a n t i t ä t der DNS-Synthese der Einzel-Zellen. Ein erniedrigter Markierungs-Index erfaßt neben der Zahl DNS-synthetisierender Zellen auch -in gewissem Umfang- die Quantität der Synthese-Leistung der Einzel-Zellen: Man kann davon ausgehen, daß jedes

markierte Thymidin-Molekül die Schwärzung eines Silberkornes verursacht (Amlacher 1974 (1)). In unseren Untersuchungen wurden als markiert die Zellkerne angesehen, die mit mehr als 10 Silberkörnern belegt waren. Es ist anzunehmen, daß bei einer stark verminderten Synthese-Leistung Zellen nicht mehr als markiert erfaßt wurden, die in der Verfügungszeit von ^{3}H-Thymidin doch in geringem Umfang noch DNS synthetisierten.

Einfluss einer geänderten Proliferationskinetik auf den Markierungs-Index:

Der Markierungs-Index als Verhältnis der markierten Zellen zur Gesamtzellzahl einer Zellpopulation ist abhängig von der Gesamtdauer des Zellzyklus und der Dauer der S-Phase. (So läßt sich im "steady state" aus der Beziehung:

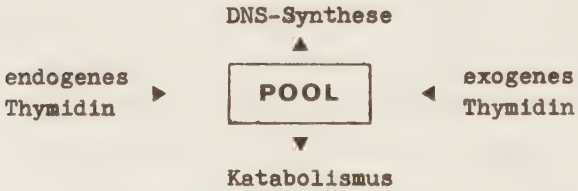
$$\text{Markierungsindex} = \frac{\text{Zahl der markierten Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} = \frac{\text{Dauer der S-Phase}}{\text{Dauer der gesamten Generationszeit}}$$

die Generationszeit einer Zell-Population berechnen). Eine Änderung der Teilphasen des Zellzyklus oder eine zeitliche Veränderung der Generationszeit stört nicht nur vorübergehend den "steady state" (solange die Änderung im Fluss ist) und führt bei Berechnungen nach obiger Beziehung zu erheblicher Ungenauigkeit, sondern beeinflusst auch die Höhe des Markierungs-Indexes. Der im Schrifttum beschriebene partielle bzw. zeitweilige G_2-Block nach Bleomycin^R-Einwirkung auf Zellen führt zu Veränderungen der Gesamtdauer des Generationszyklus und damit zu einer Senkung des Markierungs-Indexes.

Werden in einem Gewebe Zellen aus dem nicht proliferierenden Compartment, also G_0-Zellen, in das Compartment proliferierender Zellen unter dem Einfluss einer Substanz "getriggert", erhöht sich innerhalb dieser Population die Zahl DNS-synthetisierender Zellen. Dann ist ein Ansteigen des Markierungs-Indexes zu erwarten.

Einfluss der Fragmentierung von Chromosomen, der DNS-Einzel- und Doppelstrangbrüche und Störung der DNS-"repair"-Mechanismen sowie der Änderungen des Thymidin-Pools.

Nach STEWART et al. 1965 (25) und Untersuchungen von STONE et al. 1965 (26) liegt zwischen zwei S-Phasen ein Pool löslicher Thymidinverbindungen vor, der die Zelle in die Lage versetzt, eine neue S-Phase einzuleiten. Exogenes Thymidin findet in der DNS-Neusynthese nur zwischen 1 - 3 % neben endogenem Thymidin Verwendung. Gleichzeitig wird ein Teil des Thymidins katabolisch metabolisiert. Damit läßt sich von folgendem Modell ausgehen:



Bei einer Reutilisation von DNS-Bruchstücken neben der normalen endogenen Synthese kann die Zelle den Anteil des exogen zugeführten Thymidins heruntersetzen; sie baut dann weniger markierte Thymidinmoleküle ein. Daraus resultiert eine Senkung des Markierungs-Indexes.

Im einzelnen bleibt ungeklärt, welcher der oben diskutierten Faktoren der Bleomycin^{R}-Wirkung in welchem Maße in unserem Experiment sich auf die Höhe des Markierungs-Indexes auswirkt.
Bei der Beurteilung der Bleomycin^{R}-Gesamtwirkung ist der Markierungs-Index unseres Erachtens jedoch ein guter Parameter, da er alle diskutierten Teilaspekte der Wirkungen auf eine Zellpopulation erfaßt.

Anmerkungen zur mathematisch-statistischen Auswertung

Zuerst war bei Zellpopulationen verschiedener Lokalisation jeweils zu untersuchen, ob sich die Mittelwerte der Markierungsindices auf den verschiedenen Zeitstufen signifikant von dem der Kontrolltiergruppe unterschied. Zur Prüfung der Lokalisations- bzw. Gewebsspezifität musste dann bei den Markierungsindex-Quotienten analog vorgegangen werden. Hierfür eignete sich der Dunnett-Test. Wie die meisten varianzanalytischen Verfahren geht er davon aus, daß die Variablen normalverteilt sind und sich die Varianzen in den einzelnen Testgruppen gleichen. Vor allem die letzte Voraussetzung scheint hier nicht erfüllt zu sein; die Stichprobenvarianzen von Kontroll- und Testgruppe unterscheiden sich zum Teil um dreistellige Faktoren. Andererseits ist der Dunnett-Test relativ unempfindlich gegen diese Abweichungen.

Für die Markierungsindices der einzelnen Organe kann in gewisser Näherung angenommen werden, sie seien normalverteilt. Daher war es möglich, die Resultate des Dunnett-Tests durch paarweise t-Tests mit Korrekturen für ungleiche Varianzen (23) zu kontrollieren. Wo die Ergebnisse erheblich differieren unterscheiden sich die entsprechenden Gruppenvarianzen erheblich voneinander oder von der durchschnittlichen Gruppenvarianz. In diesen Fällen müssen signifikante Unterschiede nach dem Dunnett-Test mit Vorbehalt betrachtet werden.

Da die Markierungsindices schließlich binominal- und nur angenähert normalverteilt sind, (dies könnte bei kleinen Werten wie bei der Blase zu Fehlern führen) wurden zusätzlich parameterfreie paarweise Tests (U-Test nach Mann and Whitney) durchgeführt.

Da die Wahrscheinlichkeiten bei den t- und U-Tests sich nicht auf Vergleiche an einem Organ beziehen, sondern nur jeweils auf paarweise Vergleiche, ist ihre Aussagekraft bezüglich der simultanen Richtigkeit aller an einem Organ festgestellten Mittelwertdifferenzen erheblich geringer als beim Dunnett-Test.
Alle Tests wurden zweiseitig vorgenommen. Um möglichst "Fehler erster Art" auszuschließen, wurden hohe Signifikanzschranken gewählt. Damit werden zwar weniger Mittelwertdifferenzen erfasst, diese jedoch mit hoher Sicherheit.

I n d i r e k t e Indizien auf einen möglicherweise vorliegenden Lokalisations- und / oder Gewebs-spezifischen Wirkungsbereich waren Untersuchungen, die auf eine unterschiedliche Aufnahme, Verteilung, Aktivierung und Inaktivierung von Bleomycin^{R} in verschiedenen Zellsystemen schließen ließen: So haben ICHIKAWA et al. (1967 (9)), ISHIZUKA et al. (1967 (10)), UMEZAWA et al. (1967 (30), 1968 (31), 1972 (32)) sowie FUJITA u. KIMURA (1970 (7)) in der Harnblase, Niere, Lunge und in Haut-Karzinomen von Versuchstieren höhere Bleomycin^{R}-Konzentrationen als in Leber, Milz, Herz und Gehirn nachgewiesen. UMEZAWA et al. (1972 (32)) nahmen eine Bleomycin^{R}-inaktivierende Substanz an, die in der folgenden Zeit auch isoliert werden konnte. Dabei handelt es sich um ein den Aminopeptidasen chemisch verwandtes Enzym, dessen Aktivität in der Leber am höchsten, in Milz, Lunge, Gehirn und Hoden bereits deutlich schwächer ist und in der Haut nahezu ganz fehlt (MÜLLER et al. 1975 (15)).

Für die Tumor-Therapie anzustreben ist eine möglichst weitgehende Spezifität der cytotoxischen bzw. cytostatischen Wirkung auf die Neubildung durch eine möglichst selektive Substanzkonzentration im Tumor. Nach den Untersuchungen von UMEZAWA et al. (1972 (32)) und LANGE et al. (1976 (12)) kann eine gewisse Bleomycin^{R}-Anreicherung in Geschwülsten angenommen werden. Auch FUJITA et al. (1968 (6)) haben bei 8 Patienten mit Penis- oder Cervix-Karzinomen die Bleomycin^{R}-Verteilung im Tumor und im angrenzenden Gewebe untersucht und dabei eine stärkere Anreicherung der antineoplastischen Substanz im Tumor gegenüber der Umgebung gefunden. Die Möglichkeit einer positiven Tumor-Szintigraphie mit Kobalt-57-markiertem Bleomycin^{R} spricht ebenfalls für eine gewisse Bleomycin^{R}-Aktivität.

bestimmter Tumoren (JUNG et al. 1974 (11)).

D i r e k t e Hinweise auf eine n a c h L o k a l i s a t i o n u n d G e w e b e u n t e r s c h i e d l i c h e Wirksamkeit von Bleomycin^{R} sind die Ergebnisse vorliegender Untersuchung. Interessant ist dabei auch der Aspekt, daß Bleomycin^{R} offensichtlich nicht nur eine generell cytotoxische bzw. cytostatische Wirkung entfaltet, von der die Wechselgewebe mit dem höchsten "turn-over" am stärksten betroffen sind. Damit unterscheidet sich Bleomycin^{R} von zahlreichen in der Tumorbehandlung eingesetzten Substanzen.

5. ZUSAMMENFASSUNG:

Bei insgesamt 42 Mäusen wurde die Beeinträchtigung der physiologischen Regeneration der Plattenepithelien (Zunge, Oesophagus, Fuss- und Schwanzepidermis), der Drüsenepithelien (Drüsenmagen, Ileum, Colon) und der Übergangsepithelien (Nierenbecken, Harnblase) bis 72 Stunden nach einmaliger Applikation von Bleomycin^{R} histoautoradiographisch untersucht.

Es wurde jeweils der Markierungsindex bestimmt, da er die im Schrifttum diskutierten Bleomycin^{R}-Wirkungen, wie Beeinträchtigung der DNS-Synthese, Änderung der Proliferationskinetik, Fragmentierung der DNS und Wiederverwendung entstandener DNS-Bruchstücke im Rahmen der "repair"-Mechanismen, qualitativ miterfasst.

Die mathematisch-statistische Prüfung der Ergebnisse auf eine Lokalisations-spezifische Wirkung von Bleomycin^{R} (Vergleich von Zellpopulationen gleicher Art aber unterschiedlicher Lokalisation) ergab bei den Plattenepithelien eine signifikant stärkere "Hemmwirkung" auf das Zungen- bzw. Oesophagusepithel. Bei den Drüsenepithelien wirkt die Substanz im Vergleich Colon : Ileum auf den Zeitstufen 8, 16 und 24 Stunden stärker hemmend auf das Colon, während nach 72 Stunden ein umgekehrtes Verhalten zu beobachten ist. 16 Stunden nach Applikation liegt im Vergleich Drüsenmagen : Colon eine signifikant stärkere Minderung der Proliferationsaktivität beim Colon vor. Dasselbe gilt für das Ileum nach 4 Stunden im Vergleich Drüsenmagen : Ileum. Bei den Übergangsepithelien konnten untereinander keine Unterschiede in der Wirkung beobachtet werden.

Bei der Prüfung von Bleomycin^{R} auf eine Gewebs-spezifisch unterschiedliche Wirkung (Vergleich Plattenepithelien :

Schleimhautepithelien : Übergangsepithelien) liess sich auf mehreren Zeitstufen eine signifikant stärkere Wirkung auf Plattenepithelien nachweisen.

Somit wurde in der hier vorliegenden Untersuchung der direkte Nachweis für ein "spezifisches" Wirkungsspektrum von Bleomycin^{R} erbracht. Damit unterscheidet sich die Substanz von zahlreichen in der Tumorbehandlung eingesetzten Substanzen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1.) AMLACHER, E.

Autoradiographie in Histologie und Zytologie

Stuttgart: G. Fischer 1974

2.) ANDREEFF, M.

Die Wirkung von Bleomycin auf die DNA-Reduplikation und die Proliferationskinetik am Modell des Ehrlich-Aszites-Tumors.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 24, 566-571 (1975)

3.) BARRANCO, S.C. and R.M. HUMPHREY

The Effects of Bleomycin on Survival and Cell Progression in Chinese Hamster Cells in Vitro

Cancer Res. 31, 1218-1223 (1971)

4.) COHEN, A.M., F.S. PHILIPS and ST.S.STERNBERG

Studies on the Cytotoxicity of Bleomycin in the Small Intestine of the Mouse

Cancer Res. 32, 1293-1300 (1972)

5.) DEIMLING, O.v., K. WITSCH und R. ROSSNER

Methoden zur nachträglichen PAS- und Feulgen-Färbung bei entwickelten autoradiographischen Paraffin-Schnitten.

Histochemie 14, 242-250 (1968)

6.) FUJITA, H.

Studies on Concentration of BLM in Blood, Urine and Tissues

16th Congress of Japan Society for Chemotherapy 1968 May 10 - 11

7.) FUJITA, H. and K. KIMURA

Blood level, tissue distribution. Excretion and inactivation of bleomycin

Proceedings of the 6. international congress of chemotherapy Tokyo, 1970, Vol. 2, 309-314

8.) ICHIKAWA, T.

Bleomycin, a new antitumor antibiotic Journal of Japan Medical Association 61, 487-497 (1969)

9.) ICHIKAWA, T., A. MATSUDA, K. MIYAMOTO, M. TSUBOSAKI, T. KAIHARA, K. SAKAMOTO and H. UMEZAWA

Biological studies ohn bleomycin A.

J. Antibiot. A 20, 149-155 (1967)

10.) ISHIZUKA, M., H. TAKAYAMA, T. TAKEUCHI and H. UMEZAWA

Activity and toxicity of bleomycin.

J. Antibiot. A 20, 15-24 (1967)

11.) JUNG, H., H. GAMM, R. WOLF und J. FISCHER

Tumorszintigraphie im Kopf - Halsbereich mit Hilfe von ^{57}Co-Bleomycin

Radiologe 14, 513-516 (1974)

12.) LANGE, J., S. LANGE, G. KREUZER, U. HAUBOLD

Untersuchungen zur Anreicherung von Radio-Bleomycin in gynäkologischen Tumoren

Geburtsh. u. Frauenheilk. 36, 436-438 (1976)

13.) MIYAKI, M., T. KITAYAMA and T. ONO

Breakage of DNA. membrane complex by bleomycin

J. Antibiot. 27, 647-655 (1974)

14.) MÜLLER, G.

Zellkinetische Untersuchungen zur Bleomycin^{R}-Wirkung am Dünndarm der Maus.

Inaugural Dissertation, Tübingen 1977

15.) MÜLLER, W.E.G. and R.K. ZAHN

Determination of the Bleomycin-Inactivating Enzyme in Small Amounts of Tissue

Prog. Biochem. Pharmacol. 11, 119-127 (1976)

16.) MÜLLER, W.E.G., Z.-I. YAMAZAKI and R.K. ZAHN

Bleomycin, a selective inhibitor of DNA-dependent DNA Polymerase from oncogenic RNA viruses

Biochem. biophys. Res. Commun. 46, 1667-1673 (1972)

17.) MÜLLER, W.E.G., Z. YAMAZAKI, W. FORSTER und R.K. ZAHN

Die Wirkung einiger Cytostatica auf die DNA Synthese in einem oncogenen RNA-Virus.

Klin. Wschr. 50, 790-793 (1972)

18.) MÜLLER, W.E.G., A. TOTSUKA, I. NUSSER, R.K. ZAHN and H. UMEZAWA

Bleomycin inhibition of DNA synthesis in isolated enzyme systems an in intact cell systems.

Biochem. Pharmacology 24, 911-915 (1975)

19.) NAGATSU, M., T. OKAGAKI, M. RICHART and A. LAMBERT

Effects of Bleomycin on Nuclear DNA in Transplantable VX - 2 Carcinoma of Rabbit.

Cancer Res. 31, 992-996 (1971)

20.) PETRES, J., D. BARON, G. KIEFER, J.-J. GLAESENER, J. HUG and M. HAGEDORN

Comparative Studies of the Incorporation Inhibition of Radioactive Nucleotides and Amino Acids in Vitro under the Influence of Adriamycin, Bleomycin and Sodium Arsenate.

Derm. Res. 257, 185-194 (1976)

21.) PROMCHAINANT, C.

Cytogenetic Effect of Bleomycin on Human Leukocytes in vitro

Mut. Res. 28, 107-112 (1975)

22.) RITTER, R., U. GANZER

Ergebnisse nach Bleomycinbehandlung von Geschwulstrezidiven im Kopf- und Halsbereich

HNO 24, 14-16 (1976)

23.) SACHS, L.

Statistische Auswertungsmethoden

Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1969

24.) SCHUMANN, J. und W. GÖHDE

Die zellkinetische Wirkung von Bleomycin auf das Ehrlich-Karzinom der Maus in vivo

Strahlentherapie 147, 298-307 (1974)

25.) STEWART, P.A., H. QUASTLER, M.R. SKOUGAARD, D.R. WIMBER, M.F. WOLFSBERG, L.A. PEROTTA, B. FERBEL and M. CARLOUGH

Fourfactor model analysis of thymidine incorporation into mouse DNA and the mechanism of radiation effects.

Radiat. Res. 24, 521-537 (1965)

26.) STONE, G.E., O.L. MILLER and D.M. PRESSCOTT

H-3-thymidine derivative pools in relation to macronuclear DNA-synthesis in Tetrahymena pyriformis

J. Cell Biol. 25, 171-177 (1965)

27.) TERASIMA, T., M. YASUKAWA and H. UMEZAWA

Breaks and rejoining of DNA in cultured mammalian cells treuted with bleomycin.

Gann 61, 513-516 (1970)

28.) UMEZAWA, H.

Recent Studies on Bleomycin
L loydia - The Journal of Natural Products 40, 67-81 (1977)

29.) UMEZAWA, H., K. MAEDA, T. TAKEUCHI and Y. OKAMI

New antibiotics, bleomycin A and B

J. Antibiot. 19A, 200-209 (1966)

30.) UMEZAWA, H., M. ISCHIZUKA, K. MAEDA and T. TAKEUCHI

Studies on Bleomycin

Cancer 20, 891-895 (1967)

31.) UMEZAWA, H., M. ISCHIZUKA, S. HORI, H. CHIMURA and T. TAKEUCHI

The distribution of ^{3}H-bleomycin in mouse tissue

J. Antibiot. 21, 638-642 (1968)

32.) UMEZAWA, H., T. TAKEUCHI, S. HORI, T. SAWA, M. ISCHIZUKA, T. ICHIKAWA and T. KOMAI

Studies on the mechanism of antitumor effect of bleomycin on squamous cell carcinoma.

J. Antibiot. A 25, 409-420 (1972)

33.) WATANABE, M., Y. TAKABE, T. KATSUMATA and T. TERASIMA
Effects of Bleomycin on Progression through the Cell Cycle of Mouse L-Cells
Cancer Res. 34, 878-881 (1974)

34.) ZAR, J.H.
Biostatistical analysis
Englewood Cliffs : Prentice Hall 1974

Herrn Professor Dr. W. Frommhold danke ich für die Unterstützung vorliegender Arbeit.
Weiteren Dank schulde ich Herrn Dr. Zielke für den Rat und die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse, sowie Frau Vees für ihre Hilfe bei der Anfertigung der Autoradiogramme.

L E B E N S L A U F

Am 28. Januar 1948 wurde ich, Volker Ulrich Bürkle, als Sohn des Richard Bürkle, Rektor i.R. und seiner Ehefrau Helene geb. Maschke in Trossingen geboren.

In Aldingen, Krs.Tuttlingen besuchte ich von 1955 bis 1959 die Grundschule, von 1959 bis 1965 das Progymnasium Spaichingen und anschließend bis 1967 das Gymnasium Tuttlingen. Dort legte ich am 24.6.1967 die Reifeprüfung ab.

Von Juli 1967 bis Dezember 1968 leistete ich meinen Wehrdienst beim 4.Fla/RakBtl. 33 in Lindau ab.

Im Sommersemester 1969 begann ich mit dem Biologie- und Chemiestudium für Lehramtskandidaten an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Ab Wintersemester 1970/71 wechselte ich in das Fach Medizin.

Die naturwissenschaftliche Vorprüfung bestand ich am 27.März 1972, die ärztliche Vorprüfung am 26.Juli 1973. Am 17.Dezember 1976 schloß ich mit bestandenem Staatsexamen das Studium ab.

Nach jeweils viermonatiger Tätigkeit als Medizinalassistent auf der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Calw, der Inneren Abteilung und Kardiologie der Krankenanstalten des Kreises Ludwigsburg und des Pathologischen Institutes der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, arbeite ich seit dem 1. Februar 1978 im letztgenannten Institut als wissenschaftlicher Angestellter.